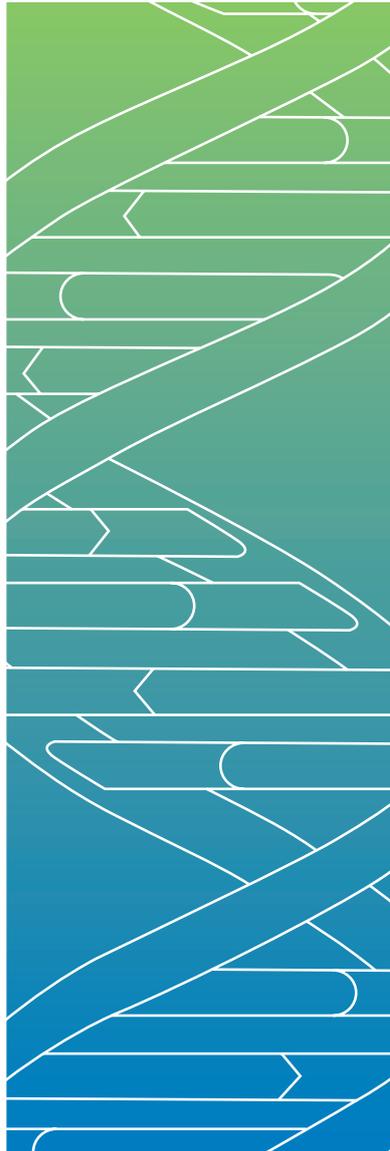




AMGEN® Biotech Experience

Scientific Discovery for the Classroom
Japan

学生用 実習プロトコル



目次

第1章: 実験ツールの操作練習

はじめに	1-1
演習1: マイクロピペットの使用方法	1-2

第2章: 遺伝子クローニングの開始(プラスミドと制限酵素)

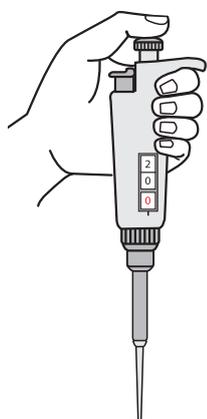
はじめに	2-1
遺伝子クローニング	2-2
演習2: <i>rfp</i> 遺伝子のクローニングの準備: pKAN-R および pARA の切断	2-5

第3章: 組換えプラスミドの構築(ライゲーション)

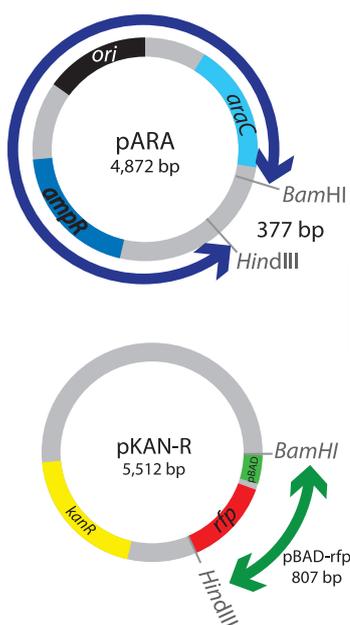
はじめに	3-1
演習3: pARA-R プラスミドの構築	3-2

全体の流れ

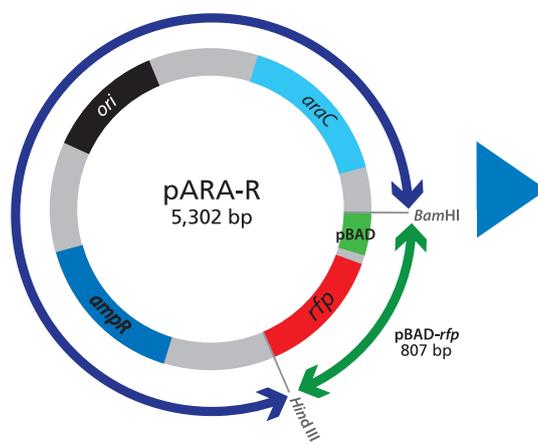
第1章



第2章



第3章



第4章:組換えプラスミドの確認(ゲル電気泳動)

はじめに	4-1
ゲル電気泳動法の仕組み	4-2
ウェルへのピペティングの方法	4-2
演習 4:ゲル電気泳動を使用した制限酵素による切断とライゲーションの検証	4-3

第5章:組換えプラスミドを得る(形質転換と培養)

はじめに	5-1
演習 5:ライゲーション生成物で細菌を形質転換する	5-2

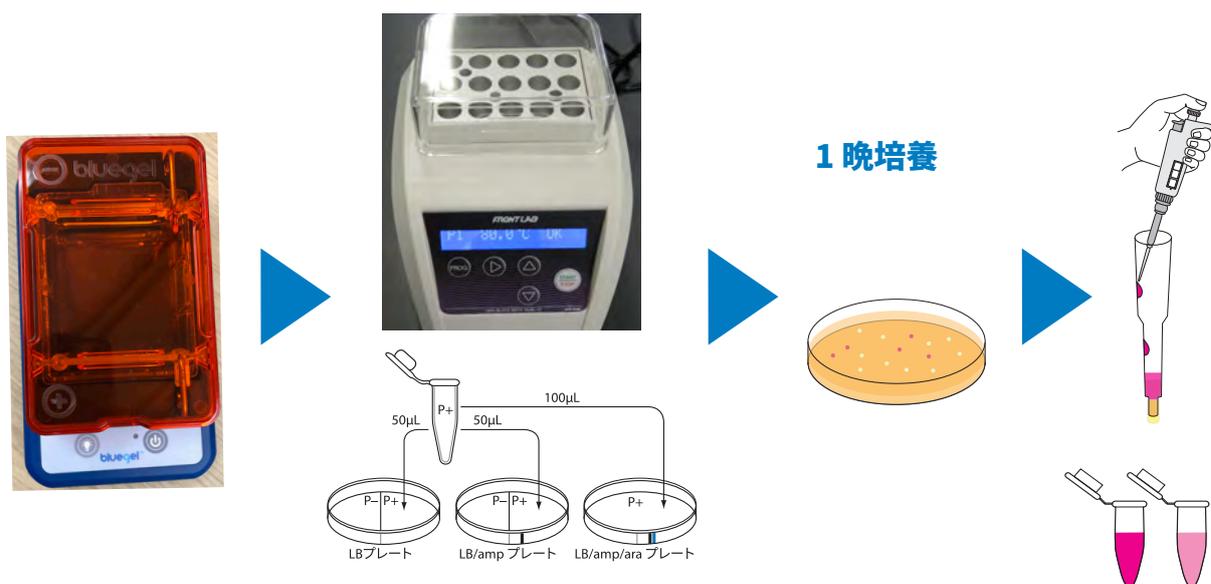
第6章:タンパク質の精製(カラム)

はじめに	6-1
演習 6:蛍光タンパク質の精製	6-2
パート A:培養した細菌の溶解	6-3
パート B:カラムクロマトグラフィーによる赤色蛍光タンパク質の分離	6-4

第4章

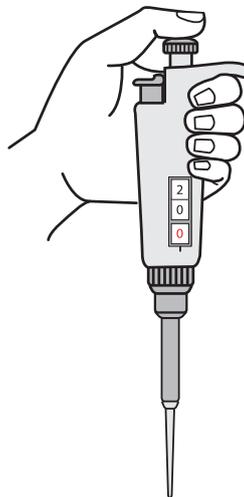
第5章

第6章



第1章

実験ツールの操作練習



はじめに

科学者が初めてヒトタンパク質を生産できる細菌の設計に成功したのは1978年。細菌細胞にヒトDNAの小さな断片(フラグメント)を導入することで実現しました。医学にとって大きなブレイクスルーです。遺伝子工学と呼ばれるこの新しい技術は、特定の遺伝子疾患の治療に役立ちます。遺伝子疾患の多くは親から遺伝した変異したDNAが原因で本来のタンパク質が作られないために起こります。この技術を使えば、細菌に本来のタンパク質を生産させ、治療に役立てることができるのです。

遺伝子工学では、バイオテクノロジーを用いて生物の遺伝子を直接操作します。遺伝子工学には優れた実験技術が必要となります。この章ではバイオテクノロジーの重要なスキルであるマイクロピペットの操作方法に焦点をあてます。

マイクロピペットとは、ごく少量の液体を移すための器具です。皆さんは、バイオテクノロジーの研究所で使用されているものと同じ機器と試薬を使用して、演習を行います。この演習は、バイオテクノロジーに必要なスキルを構築するための最初のステップです。

第1章の目標

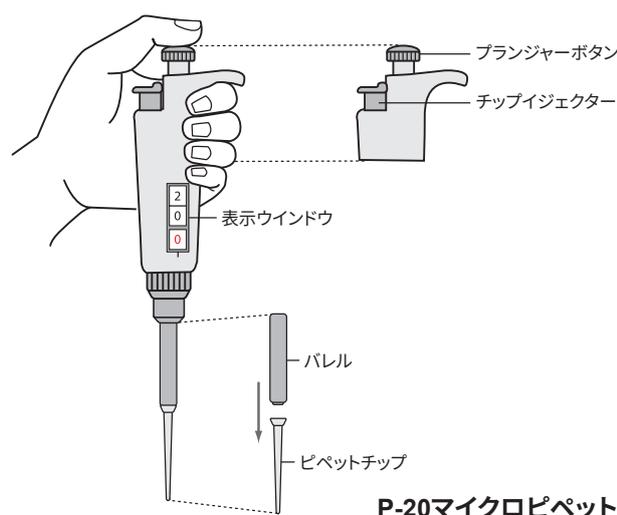
- ・ 遺伝子工学におけるマイクロピペットの重要性を理解し、マイクロピペットを正しく操作できるようになる。

事前の確認

1. バイオテクノロジーのツールやテクニックを使用したことがありますか？
それは何ですか？ 何のためにそれらを使用しましたか？
2. バイオテクノロジーの手順を実行するときに、精度が重要なのはなぜですか？

演習 1: マイクロピペットの使用方法

この演習の目的は、遺伝子工学で使用される重要なツールであるマイクロピペット(下図)を知ってもらうことです。マイクロピペットは、遺伝子工学で最もよく使用されるミリリットル(mL、1000分の1リットル)またはマイクロリットル(μL 、100万分の1リットル)単位のごく少量の液体を正確に移すために使用されます。この演習では、マイクロピペットの使用方法を学び、この非常に正確なツールで測定されたさまざまな量の溶液の相対的なサイズを視認し、この器具を使用してどれだけ正確な量を測定できるかを確認することができます。



実験の前に

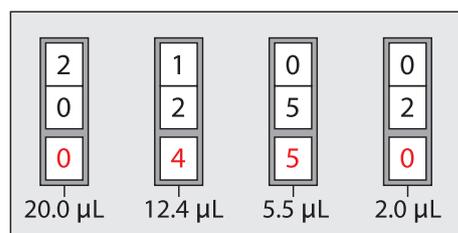
グループで次の質問に回答し、回答をクラスと共有する準備をしてください。

1. なぜバイオテクノロジーにおいてごく少量の材料を正確に使用する必要があると思いますか？
2. 次の**方法**の箇所をすべて読み、用語を使って、フローチャートを作成し、手順を簡単に確認してください。

方法

1. プランジャーボタンを回し、マイクロピペットを以下に示す量に設定する練習をします。

安全上の注意: 規定範囲外に設定しないこと。破損する可能性があります。

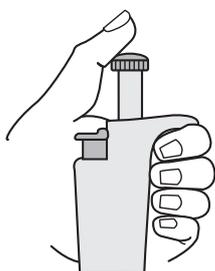


マイクロピペットに示された4つのマイクロピペット規定量





2. 測る練習を行う前にマイクロピペットの基本操作を確認しましょう。
 1. 測り取る量に表示ウインドウを合わせる。
 2. チップをつける
 3. 液体を吸う前にプランジャーボタンを静かに押し下げて第 1 ストップで止める
注意:この時、第2ストップまで押し下げると、合わせた量以上を吸い取ることとなりますので、注意してください
 4. プランジャーボタンは押し下げたまま、測り取る液体にチップの先を入れる
 - 5 ゆっくりとプランジャーボタンから指を離す
 6. 液体を移す先でプランジャーボタンを静かに押し第 1 ストップまで押し、さらに第 2 ストップまで押し、出し切る



押し下げて最初に抵抗を感じる部分が第 1 ストップ



さらに押し下げたところが第 2 ストップ

3. ラミネートされたマイクロピペット演習シートを確認します。
 各グループメンバーは、異なる量の 5 滴をシートにピペットで滴下します。ピペッティングは、液体をマイクロピペットで採取し、液体をマイクロピペットから分注するという2段階で構成されています。
4. 講師の指示に従って、20.0 μL の青色染料 (BD) をマイクロピペットにとります。
5. ラミネートシート上の 20.0 μL と書かれたスペースに BD を分注します。
6. 同じマイクロピペットチップを使用して、15.0 μL 、10.0 μL 、5.0 μL 、および 2.0 μL の各量を調整して、残りの各スペースに BD を採取および分注します。
7. 各スペースを埋めた後、チップイジェクターを使用してマイクロピペットチップを廃棄物容器に入れます。グループ全員が演習シートに BD を分注する機会を得たら、ノートに各ドロップのおおよそのサイズを描き(または写真を撮ってノートにテープで貼り付け)、各ドロップに量を書き留めます。

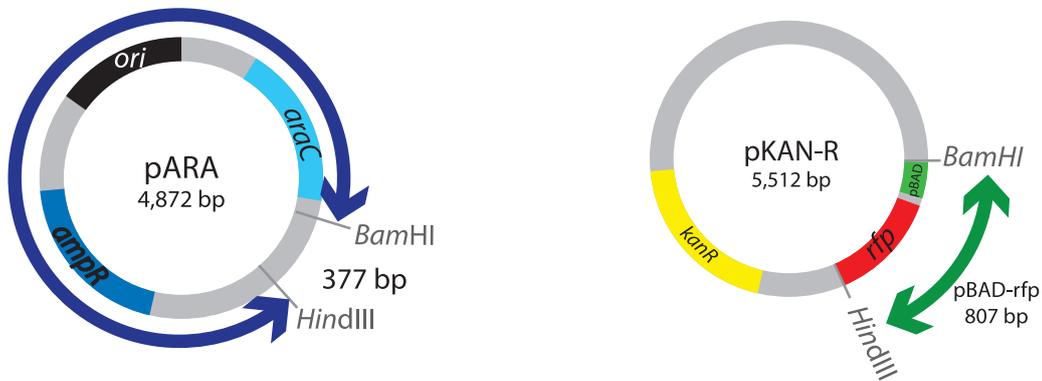
考えましょう。

- 溶液を吸いとるまたは分注するとき、溶液がマイクロピペットのチップに出入りするのを実際に見ることが重要なのはなぜですか？
- マイクロピペットチップを触らないように(例:マイクロピペットを下に置かないでいように手を使わずにマイクロピペットチップを装着する、エジェクターボタンを使用してチップを取り外す、チップボックスは閉じたままにする)指示されました。プラスミドと細菌細胞を使用している場合、これらの予防措置が重要なのはなぜですか？



第2章

遺伝子クローニングの開始(プラスミドと制限酵素)



はじめに

第1章で、バイオ医薬品の開発に使用される技術を紹介しました。そのうちの1つ、細菌の形質転換は、ヒトの遺伝子を細菌に挿入して、細菌がヒトの治療用タンパク質を生産できるようにする技術です。また第1章では、遺伝子のクローニングに使用される物理的ツール(マイクロピペット)を実際に使用しました。

この章では、プラスミドと制限酵素という2つの重要な生物学的ツールを使用します。これらの「ツール」は、実際には多くの細菌に在る生体分子です。これらのツールを使用して、科学者は微生物を改変してヒトのタンパク質を作ることができるようになりました。遺伝子のクローンを作成するための最初のステップを演習しましょう。

第2章の目標

- プラスミドの特性を理解する
- 遺伝子のクローニングでプラスミドがどのように使用されるかを理解する
- 制限酵素の機能を理解する
- 制限酵素を使用して組換えプラスミドを作成する方法を理解する

事前の確認

1. DNAの構造と機能はどのようなものですか？DNA分子の構造を言葉または図でできるだけ詳しく説明してください。
2. すべての生物にはDNAが含まれています。異なる生物のDNAで、どのような点が同じで、どのような点が違いますか？
3. 遺伝子とその発現機序(遺伝子の情報は、まずメッセンジャーRNAに変換され、次にタンパク質に変換されます)を理解したうえで、細菌細胞がヒト遺伝子からヒトタンパク質をつくることのできる理由を説明してください。
4. 科学者は、プラスミドと制限酵素という2つの生物学的ツールを使用し、目的のタンパク質を作成します。プラスミドと制限酵素は新しいタンパク質の作成にそれぞれどのように役立ちますか？

遺伝子クローニング

遺伝子クローニングに使われる2つの生物学的ツールであるプラスミドと制限酵素について理解しましょう。

1. プラスミドにはいくつかの重要な機能があります。
 - *ori* 部位とよばれる DNA 複製開始のための配列があるため、宿主 DNA 合成酵素を用いて細菌内で DNA を複製できる
 - 挿入された遺伝子の転写を開始するためのプロモーターを持っている
 - 抗生物質耐性タンパク質の遺伝子があり、プラスミドを取り込んだ細菌を同定できる
2. 制限酵素は、プラスミドと、クローニングする目的の遺伝子(インスリンなど)を含むヒト DNA の両方を切断します。

この2つのツールを使用して、細菌プラスミドに挿入されたヒト遺伝子を含む組換えプラスミドを作成する方法では、プラスミドとヒト DNA を切断する制限酵素を選択することが重要なステップの1つです。制限酵素は次のすべての要件を満たす必要があります。

- 目的の遺伝子の挿入が可能な部位でプラスミドを切断する
- 適切な部位でプラスミドを切断するが、*ori* 部位、プロモーター、および抗生物質耐性遺伝子の少なくとも1つなど、重要な遺伝子または配列を破壊しない
- 挿入された遺伝子が発現できるように、プロモーターの近くでプラスミドを切断する
- 目的の遺伝子の両端にできるだけ近い位置でヒト DNA を切断し、遺伝子内を切断せずにプラスミド DNA の適切な部位に挿入できるようにする



考えましょう: ヒトDNAからプラスミドと遺伝子の両方を切断するのに、同じ酵素を用いることがなぜ重要なのでしょう？

ペーパーモデルでの確認

実際の演習に入る前に、ペーパーモデルでプラスミドと制限酵素についてよく考えてみましょう。

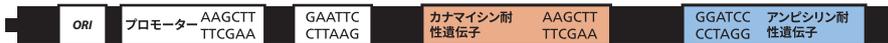
下記の3つを満たすように、ヒト治療用タンパク質(この場合はインスリン)の遺伝子を含む組換えプラスミドのペーパーモデルを作成してください。

1. 適切な制限酵素でプラスミドとヒト DNA を切断する
2. ヒトインスリン遺伝子をプラスミド DNA に挿入する
3. プラスミドに取り込まれた細菌を特定するために使用する抗生物質を決定する

手順

1. プラスミドのペーパーモデルとヒト DNA 配列のペーパーモデルが配布されます。

プラスミドペーパーモデル



ヒト DNA ペーパーモデル



プラスミドのペーパーモデルの両端をテープで止めて環状にしてください。

また、2つのペーパーモデルで下記を確認してください。

- *ori* 部位、プロモーター、抗生物質耐性遺伝子の位置
 - 各制限酵素の認識サイトの位置
2. プラスミドの切断に使用する制限酵素を選択します。制限酵素が次のすべての基準を満たしていることを確認します。
 - プロモーターを切断しない
 - 少なくとも1つの抗生物質耐性遺伝子は切断しない
 - プラスミドを一度だけ切断する
 - プロモーターの近傍を切断する
 3. 下の表を見て、制限酵素が切るとまったく同じように、認識部位でプラスミドをハサミで切ってください。プラスミドの各末端に残っているヌクレオチドの配列を書きます。

この演習で使用されている制限酵素

制限酵素	認識配列	酵素の由来
Eco RI エコアルワン	5' G AATT C 3' 3' C TTAAG 5'	Escherichia coli 大腸菌
Bam HI バムエイチワン	5' G GATC C 3' 3' C CTAGG 5'	Bacillus amyloliquefaciens バチルス・アミロリケファシエンズ
Hind III ヒンドスリー ヒンディースリー	5' A AGCT T 3' 3' T TCGA A 5'	Haemophilus influenzae ヘモフィルス・インフルエンザ菌

赤線は、DNA が切断される場所を示します。

4. ヒト DNA 配列を見て、3つの制限酵素、*Bam* HI、*Eco* RI、*Hind* III がどこを切断するかを確認します。
5. ステップ2で選択した制限酵素が、以下のすべての基準を満たしていることを検証して、ヒト DNA からインスリン遺伝子を切り出すのに適しているかどうかを判断します。
 - インスリン遺伝子内で切断しない
 - 遺伝子の基端と末端にごく近い位置で切断する
 - インスリン遺伝子を切断したプラスミドに挿入できるようにする

6. **上の表**を見て、制限酵素が切るのとまったく同じように、認識部位でプラスミドをハサミで切ってください。インスリン遺伝子がヒト DNA から切断された後、インスリン遺伝子の各末端に残るヌクレオチドの配列を書きます。
7. テープを使用して、インスリン遺伝子を切断プラスミドに挿入します。粘着末端が正しい方向で接続されていることを確認します。(ラボの演習では、3 番目の生物学的ツールである DNA リガーゼを使用して、粘着末端を恒久的に結合します。) これで、インスリン遺伝子を含む組換えプラスミドのペーパーモデルができました。プラスミドが複製(コピー)されると、インスリン遺伝子もコピーまたはクローニングされます!

質問

1. どの制限酵素を選択しましたか? なぜそれを選んだのですか?
2. インスリン遺伝子をどこに挿入しますか? その理由は?
3. 組換え DNA が取り込まれたことを確認するために、どの抗生物質を使用しますか?

演習 2: *rfp* 遺伝子のクローニングの準備: pKAN-R と pARA の切断

この演習の目的は、制限酵素を使用して、組換えプラスミドを作成する素材となる DNA フラグメントを生成することです。作成した組換えプラスミドが、細菌内で赤色蛍光タンパク質 (RFP) を生成できるように制限酵素で切断する必要があります。制限酵素で DNA を切断することは制限酵素処理と言い、フラグメントの長さはゲル電気泳動によって確認できます (第4章で行います)。

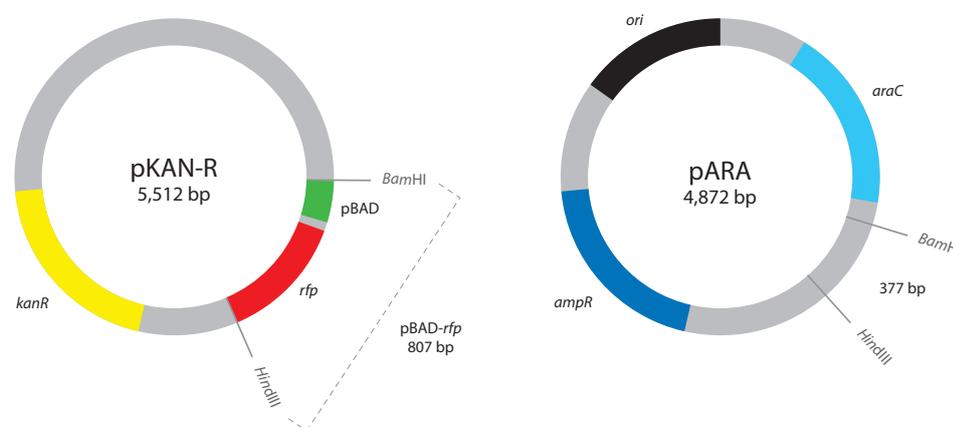
rfp 遺伝子をクローニングするには、pKAN-R と pARA (詳細については次の表を参照) という2つの異なるプラスミドの DNA を用いて組換えプラスミド pARA-R を作製する必要があります。

pKAN-R および pARA プラスミドの比較

pKAN-R に含まれるもの...	pARA に含まれるもの...
<ul style="list-style-type: none"> 細菌を抗生物質耐性にする遺伝子 カナマイシン耐性遺伝子 <i>rfp</i> 遺伝子 プロモーター配列 	<ul style="list-style-type: none"> 細菌を抗生物質耐性にする遺伝子 アンピシリン耐性遺伝子 DNA 複製を開始するための <i>ori</i> 部位 5 炭糖アラビノースの存在下で細菌が増殖したときにプロモーターを活性化する DNA シーケンス (<i>araC</i>)

アラビノースが存在しない場合、プロモーターは RNA ポリメラーゼに結合せず、転写は起きません。

下図はプラスミドのサイズ (中央の数は塩基対 [bp] の数を示す) と制限酵素 *Bam*HI および *Hind*III で切断できる配列を示しています。



pKAN-R および pARA プラスミド





実験の前に

グループで次の質問に回答し、回答をクラスと共有する準備をします。

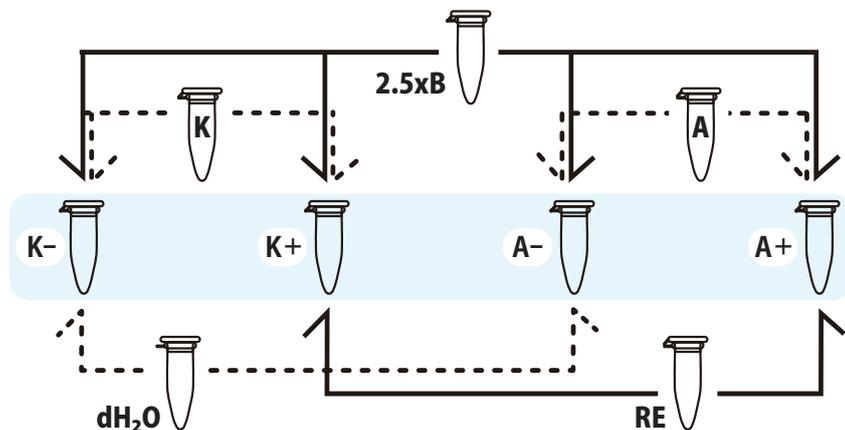
1. 前ページの図を参照してください。pKAN-R を *Bam*HI と *Hind*III で処理すると、どんなフラグメントが生成されますか？ pARA を *Bam*HI と *Hind*III で処理すると、どんなフラグメントが生成されますか？ 末端のヌクレオチド配列と各フラグメントの長さ (bp) を記録し、各フラグメントに存在する遺伝子およびその他の重要な配列を示してください。
2. 細菌で赤色蛍光タンパク質を産生できるプラスミドを作成するには、プラスミドにどのような構成要素が必要ですか？
3. 抗生物質耐性遺伝子は、選択マーカーとして利用されています。抗生物質を使っても生き残るのは、抗生物質耐性遺伝子を持つ細菌だけだからです。細菌は、抗生物質耐性遺伝子を持つプラスミドを保有していない限り、抗生物質によって死滅します。細菌による DNA の取り込みが効率的でない場合、選択マーカーが重要となるのはなぜですか？
4. 次の方法の箇所をすべて読み、フローチャートを描き出し、手順を確認してください。

方法

1. 4本の微量遠心チューブを準備し、油性マーカーでキャップにグループIDを記入します。次に、各チューブを識別するために、各キャップに K-、K+、A-、A+ と書きます。
2. 汚染防止のため、各試薬に新しいマイクロピペットチップを使用して、下記の表の通りに a. 2.5 X B、b. K、c. A、d. RE、e. dH₂O を添加します。

	K- チューブ	K+ チューブ	A- チューブ	A+ チューブ
a. 制限酵素用バッファー (2.5xB)	4.0 μL	4.0 μL	4.0 μL	4.0 μL
b. pKAN-Rプラスミド (K)	4.0 μL	4.0 μL		
c. pARAプラスミド (A)			4.0 μL	4.0 μL
d. <i>Bam</i> HI および <i>Hind</i> III (RE)		2.0 μL		2.0 μL
e. 蒸留水 (dH ₂ O)	2.0 μL		2.0 μL	

* d および e の場合:微量遠心チューブの底の溶液に直接添加し、溶液を静かにピペティングして、試薬を混和します。完了したらキャップを閉めます。



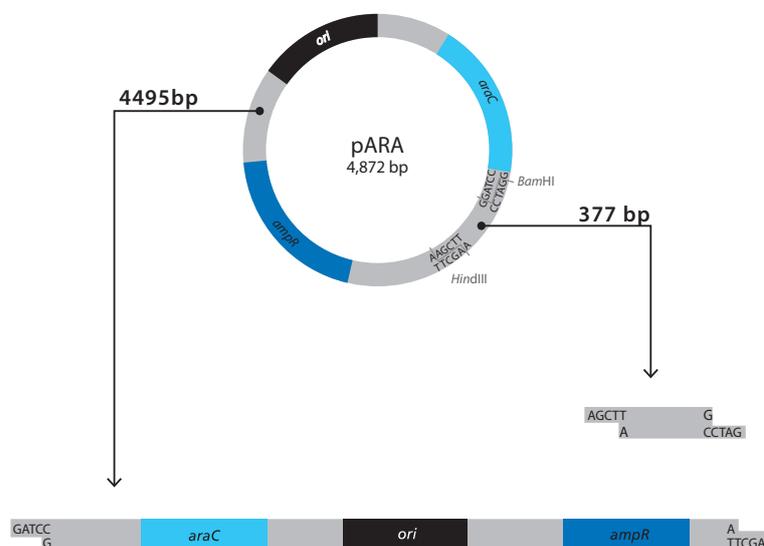
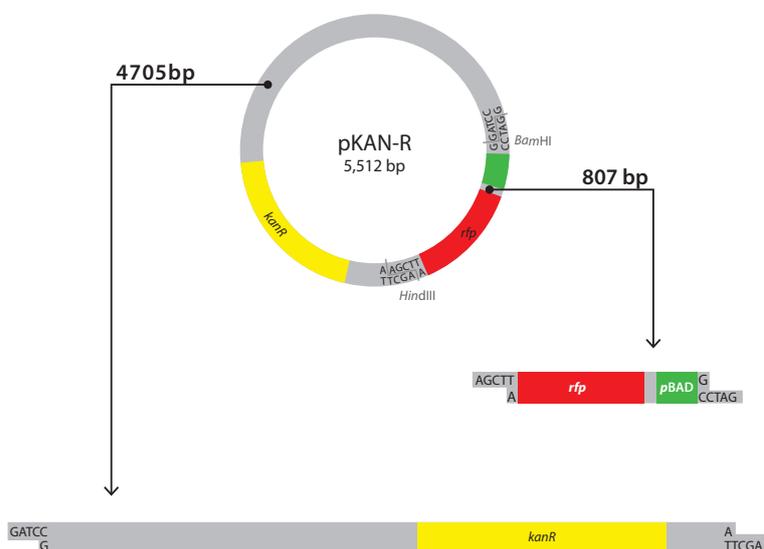
3. 4本の微量遠心チューブ(K-, K+, A-, およびA+)を微量遠心分離機に均等に配置し、数秒間スピンドして、各チューブの底に溶液を集めます。

4本のチューブすべてを、37°Cのヒートブロックに入れて開始時間を記録します。5分以上15分以内で反応を行います。

連続して作業を行わない場合は、反応が完了したら、4本すべてのチューブを-20°Cの冷凍庫に入れます。演習3でこれらのチューブの内容物を使用します。

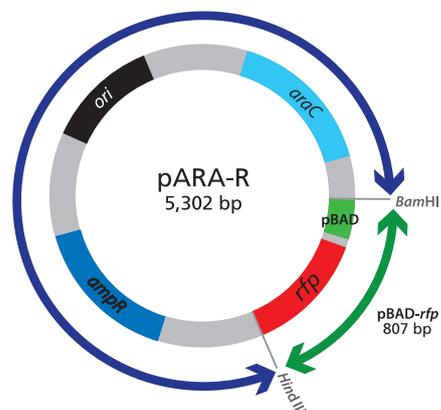
考えましょう。

- 方法2では、制限酵素Bam HIおよびHind IIIを加えないチューブも用意しました。このステップの目的は何ですか、なぜそれが重要なのですか？
- なぜ酵素は37°Cで最もよく働くのでしょうか？（ヒント：通常のヒト体温は約37°Cです。）



第3章

組換えプラスミドの構築(ライゲーション)



はじめに

第1章と第2章では、遺伝子工学の重要なツール、マイクロピペット、プラスミド、制限酵素について学びました。第2章の演習2では、組換えプラスミドに組み込むことができるようにDNAをフラグメントに切断しました。

この章では、遺伝子のクローニングに必要なツールであるDNAリガーゼを使用して、フラグメントを結合(貼り付け)します。DNAリガーゼは、DNAフラグメントの結合を触媒する(反応速度を高める)酵素で、あらゆる細胞のDNA複製に関与する酵素の1つです。今回の実習ではヒトインスリンではなく、観察しやすい赤色蛍光タンパク質(*rfp*)遺伝子を持つ組換えプラスミドを作成します。

第3章の目標

- 複製におけるDNAリガーゼの役割を理解する
- DNAリガーゼを使用して組換えプラスミドを作成する方法を理解する
- 制限酵素切断産物を結合する際に形成される可能性のある組換えプラスミドを理解する

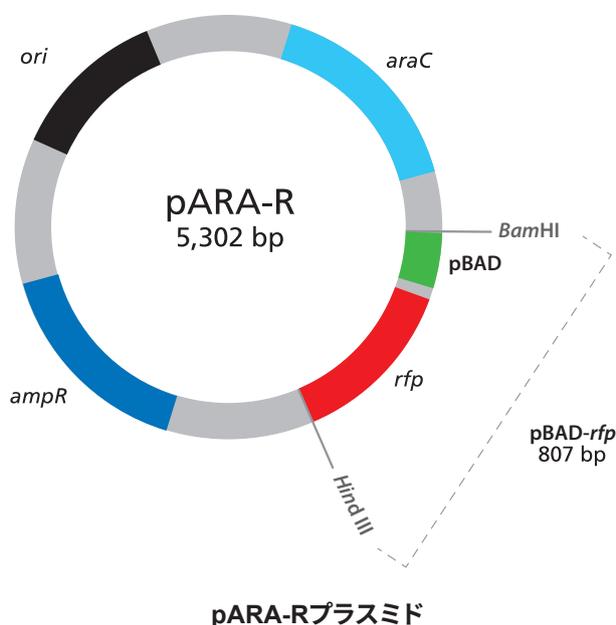
事前の確認

- 反応において酵素はどのように働きますか?
- DNA複製はどのように起こりますか?
- すべての細胞においてDNAの複製が不可欠なのはなぜですか?
- 相補的な末端を持つ2つのDNAフラグメントが結合するとどうなりますか? DNAリガーゼによる結合はどの程度永続的ですか?

演習 3: pARA-R プラスミドの構築

この演習では、演習2で作成した DNA フラグメントを DNA リガーゼを使用して結合し、組換えプラスミドを作成します。作成した組換えプラスミドには、演習 2 で得られた4 本の制限酵素フラグメントが異なる方法で再結合したものが含まれています。ライゲーションの組み合わせにより、いくつかの異なるプラスミドが生成されるためです。

目的のプラスミドにはアンピシリン耐性遺伝子 (*ampR*)、赤色蛍光タンパク質 (*rfp*) 遺伝子、転写を開始するためのプロモーター配列 (pBAD)、アラビノース活性化因子配列 (*araC*)、そして DNA 複製の開始のための *ori* 配列が含まれます。この目的の組換え DNA プラスミドは、「pARA-R プラスミド」と呼ばれます(下図参照)。



ゲル電気泳動法を用いて、DNA 分子を分離および識別する機会が得られるのは演習 4 となり、それまでは何も観察できません。ただし、できる可能性のあるプラスミドを予想し、これらのプラスミドの図を描くことで、目的の組換えプラスミドについて理解を深めることができます。

実験の前に

グループで次の項目を話し合い、回答を記録し、クラスと回答を共有する準備をします。

1. 演習 2 の「実験の前に」で示された質問 1 に対する回答 (*Bam*HI および *Hind*III による pKAN-R および pARA の切断で形成された断片について説明したもの)を見直してください。この情報を使って、2 つの pKAN-R フラグメントと pARA フラグメントの結合から生じる 3 つの可能な組換えプラスミドを描画します。各プラスミドについて、遺伝子、その他の重要な配列、およびそれぞれが持っている塩基対の数を特定します。
2. 次の**方法**の箇所をすべて読み、フローチャートを描き出し、手順を確認してください。



方法

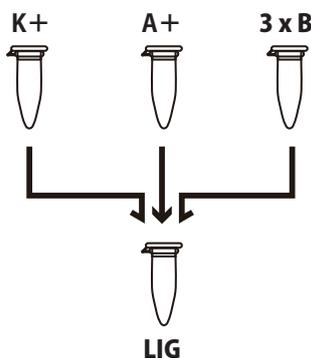
1. 演習 2 で用意した K+ チューブと A+ チューブを 80 °C のヒートブロックに 20 分間入れて、制限酵素を変性 (不活性化) します。

注意: インキュベーション中に、「実験の前に」で示された質問 1 の回答を共有して話し合います。また、以下の「考えましょう」の質問に対する答えを共有し、議論します。

考えましょう。

なぜ断片を連結する前に *Bam*HI と *Hind*III 制限酵素を不活性化することが重要なのですか？ この手順を実行しなかった場合はどうなりますか？

2. 20 分後、K+ および A+ チューブをヒートブロックから取り出し、ラックに入れます。
3. 事前に 2 μ L のリガーゼ酵素が分注された LIG チューブに、あなたのグループ ID を記入します。下記の a から c をチューブの底の溶液に直接加え混和します。溶液ごとに新しいマイクロピペットチップを使用してください。
 - a. K+ : 4.0 μ L
 - b. A+ : 4.0 μ L
 - c. 3 x B : 5.0 μ L



4. バランスを取った微量遠心機で LIG チューブを数秒間回転させて、チューブの底に溶液を集めます。
5. LIG チューブをラックに置き、室温で 15 分間インキュベートします。
連続して作業を行わない場合、演習 4 で使用するために、A+ および K+ チューブを -20 °C の冷凍庫に戻します。

第4章

組換えプラスミド作成の確認(ゲル電気泳動)



はじめに

科学者は、医療目的に用いるタンパク質を生産するために遺伝子をクローニングするとき、対象のヒト遺伝子を組み込んだ組換えプラスミドを作成します。そのためには、制限酵素を使ってプラスミド成分を含む DNA フラグメントを作成し(第 2 章)、次に DNA リガーゼを用いてフラグメントを結合します(第 3 章)。遺伝子クローニングプロセスの一環として、必要とする組換えプラスミド、すなわち、目的の遺伝子と、そのタンパク質を作るために必要なすべての要素を持つプラスミドが作成されたかどうかを検証(確認)しなければなりません。

この章では、遺伝子工学のツールを引き続き使用しながら、赤色蛍光タンパク質(RFP)を生成するために必要な組換えプラスミドが得られたことを確認していきます。

第4章の目標

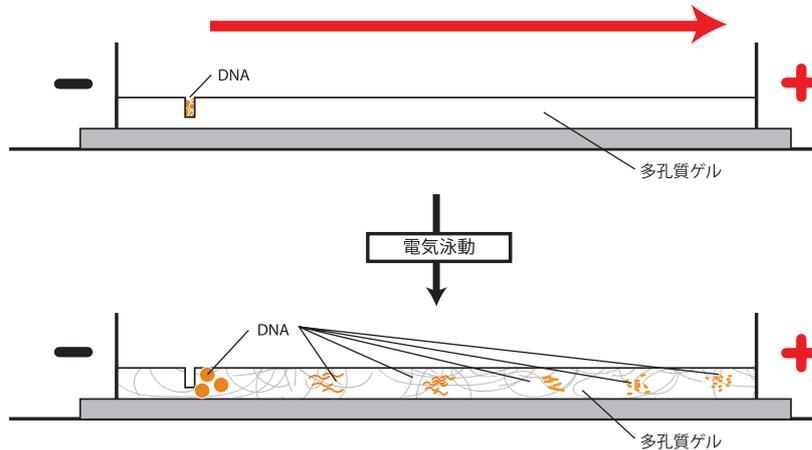
- 遺伝子工学プロセスで作成された生成物を検証することが重要である理由を理解する
- ゲル電気泳動でゲルを移動する DNA 制限酵素フラグメントとプラスミドの相対速度を予測する
- ゲル電気泳動を使用して DNA 制限酵素フラグメントとプラスミドを分離および識別する

事前の確認

1. ゲル電気泳動で分析したときに DNA 制限酵素切断フラグメントとプラスミドが分離するのはなぜですか？
2. 組換えプラスミドを特定して検証することが重要なのはなぜですか？
3. DNA フラグメントを DNA リガーゼで結合すると、複数の生成物ができます。これはどのように起こりますか？

ゲル電気泳動法

電気泳動装置は、アガロースゲルを含むボックスと、ボックスを電源に接続したときにゲル全体に電界を作り出す2つの電極で構成されます。陰極は黒、陽極は赤です。DNAを含む試料は、陰極(黒)近くのウェルにピペットで注入します。DNAはゲルを通過して陽極(赤)に向かって移動します。

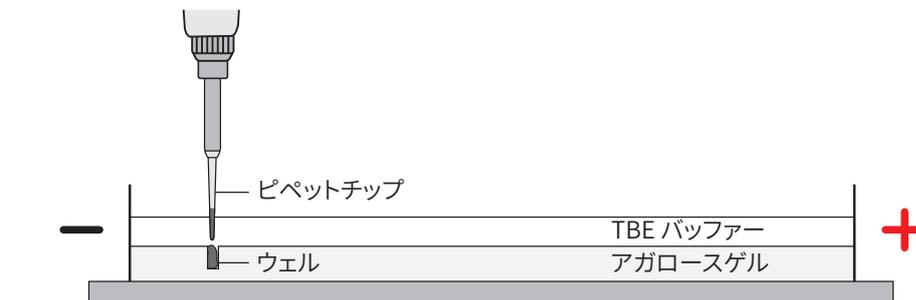


ゲル電気泳動法での DNA を含む生体分子のアガロースゲルマトリックス内の移動

ウェルへのピペッティングの方法

アガロースゲルにあらかじめ形成されたウェルに試料をピペッティングするには注意が必要です。

- 肘をテーブルに置き、手を安定させます。必要に応じて、もう一方の手を使用して、マイクロピペットを持っている手を支えます。
- 以下に示すように、バッファーより下でウェルのすぐ上の高さまでマイクロピペットチップを下ろします



- プランジャーを静かに押して、試料をゆっくりと分注します。空気混入防止のため第1ストップを超えてプランジャーを押さないようにします。バッファーからチップを引きあげるときは、プランジャーを押し下げたままにします。

演習 4 : ゲル電気泳動法を用いた制限酵素による切断とライゲーションの検証

この演習では、ゲル電気泳動を使用して、pKAN-R および pARA プラスミドの制限酵素切断による生成物 (演習 2) を調べ、ライゲーションの生成物 (演習 3) を検証します。演習で行った作業は、検証することが重要です。あらゆる段階 (遺伝子のクローニングに使用される手順を含む) にエラーを起こしうるさまざまな原因があります。遺伝子クローニングでは、いくつかの手順が決定的ではないという問題もあります。たとえば、DNA リガーゼを使用して DNA フラグメントをライゲーション (結合) すると、このライゲーションプロセスの結果、さまざまな組み合わせが生じます。検証しない限り、必要な組換えプラスミドを作成できたかどうかはわかりません。

DNA フラグメントのサイズは、DNA ラダー (既知のサイズの DNA フラグメントの混合物) と比較して決定します。DNA ラダーは、サンプルのバンドとラダーのバンドを比較しやすくするために、他の DNA サンプルの隣に流します。ゲル電気泳動を実行すると、短い線状の DNA フラグメントは予想どおりに移動しますが、プラスミドの移動はそれほど単純ではありません。これは、同じプラスミドであっても、異なる構造を取る場合があります、ゲル内の移動速度が異なる可能性があるためです。プラスミドの構造には、スーパーコイル、ニック、マルチマーの3つがあるため、単一のバンドが見られるはずのところいくつかの未切断プラスミドのバンドがみられる場合があります。

ゲル電気泳動の結果から、制限酵素による切断およびライゲーションの手順が成功し、*rfp* 遺伝子を含む pARA-R 組換えプラスミドが作成されたことの証拠が得られます。

実験の前に

グループで以下の項目について話し合い、クラスと共有する準備をします。

1. 演習 2 で制限酵素により切断した pKAN-R および pARA プラスミドは、細菌内で増やしたものです。これらの2つのプラスミドは、切断前にどのような構造 (スーパーコイル、ニックの入ったサークル、マルチマー) であったと考えられるでしょうか？
2. 演習 3 で実施したライゲーションにより、多数のプラスミドが生成される可能性がありますが、これらはいずれも細菌内では複製されていません。スーパーコイル、ニックの入ったサークル、マルチマーのいずれの構造がライゲーションされたプラスミドにあったと考えられますか？
3. さまざまなプラスミド構成を含め、可能性のあるすべての生成物を予測する必要があります。演習 2 および 3 での作業を見直します。K⁻、K⁺、A⁻、A⁺、および LIG チューブにどのような生成物が予測できますか？ チューブごとに可能なすべてのフラグメントとプラスミドを記載した表を作成します。各フラグメントまたは予想プラスミドの長さ (bp サイズ) を記載し、各微量遠心チューブ内にみられる生成物をサイズの小さい順に並べてください。可能性のあるプラスミド構成をすべて記載し、最初にサイズで並べ、次にゲルを通る速度が速い順で並べてください。
4. 方法のセクションをすべて読み、用語とフローチャートを使用して、手順を簡単に確認します。





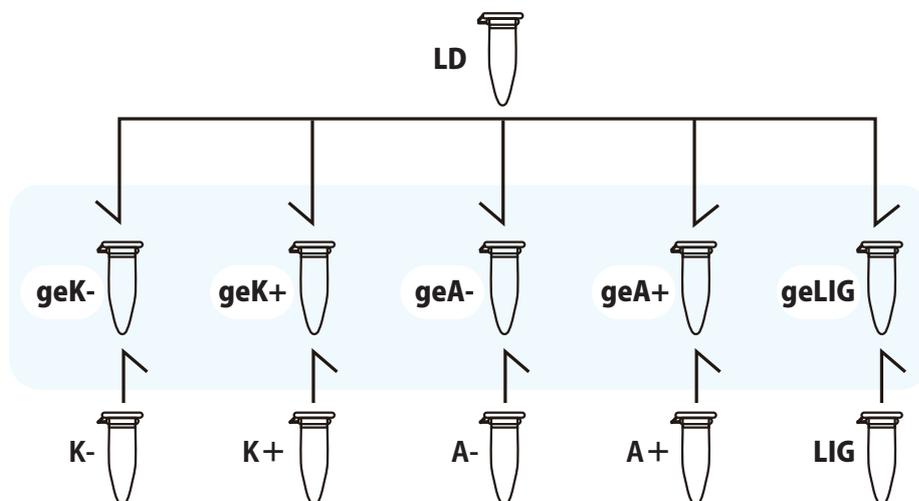
方法

1. 講師から必要なサンプルが配布されます。(M: マーカー、LD: ローディング色素)
2. 5本の滅菌済みの微量遠心チューブを準備します。油性マーカーで、チューブキャップにグループIDと「geA-」、「geA+」、「geK-」、「geK+」、および「geLIG」を記入します。

注意: ge = ゲル電気泳動

3. 試薬ごとに新しいマイクロピペットチップを使用してください。制限酵素による切断およびライゲーションの手順を検証するには、下の表を指針として各チューブに試薬を追加します。

	geK- チューブ	geK+ チューブ	geA- チューブ	geA+ チューブ	geLIG チューブ
a. ローディング色素 (LD)	6.0 μL				
b. 未切断pKAN-R (K-)	4.0 μL				
c. 切断pKAN-R (K+)		4.0 μL			
d. 未切断pARA (A-)			4.0 μL		
e. 切断pARA (A+)				4.0 μL	
f. 連結プラスミド (LIG)					4.0 μL



4. **連続で作業を行わない場合**、すべての試薬を加えた後、次の演習で使用するために「LIG」チューブを講師に返却します。
5. 微量遠心機に5本の微量遠心チューブを均等に配置し、数秒間回転させます。
6. ゲル電気泳動ユニットのウェルが陰極(黒)の近くにあることを確認します。
7. ボックスに、電気泳動用バッファーをゲルの表面全体をちょうど覆うレベルまで注入します。ウェルにくぼみがある場合は、バッファーを追加します。

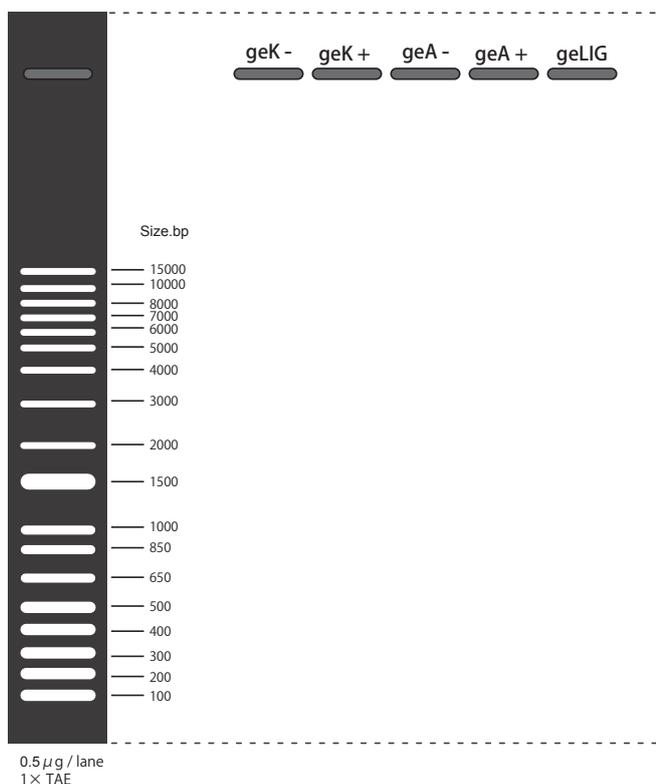
8. 電気泳動ボックスのウェルの位置を示す図をノートに描きます。各ウェルのサンプルの順序は以下に示されています。



9. サンプルごとに新しいマイクロピペットチップを使用して、DNA マーカー/ラダー (M)、geK-、geK+、geA-、geA+、および geLIG を指定のウェルに 10.0 μ L ずつ分注します。すべてのサンプルをアプライしたら、電気泳動ボックス (オレンジ) のカバーをしっかりと閉じて、講師が指示した電圧で電源をオンにします。
10. 2、3 分後、ローディング色素が陽極に向かって移動しているかどうかを確認します。逆方向、つまり陰極に向かって動いている場合は、導線をチェックして、電源に正しく接続されているかどうかを確認します。
11. 講師がゲルの取り扱いに関し説明します。電気泳動を完了するのに十分な時間がない場合は、最小のローディング色素分子 (黄色/オレンジ) を使えば、ゲルの端までに約 30 ~ 50 分 (機器によって異なります) で完了できます。ゲル電気泳動が完了したら、DNA フラグメントとプラスミドの位置を示す画像を作成する必要があります。

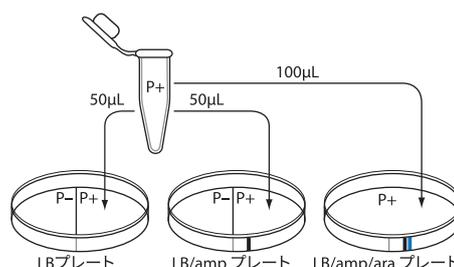
考えましょう。

- 左ページ下写真のDNA ラダーは、既知のサイズの DNA 分子の混合物を含むため基準として機能します。サンプルと DNA ラダーをゲル内で並べて分析することにより、未知の DNA 分子の塩基対のサイズを推定できます。左下図は既知のサイズの 10 の DNA バンドを示しています。この情報を用いて、K-、K+、A-、A+、および LIG チューブの生成物によって生じるすべての DNA バンドの位置を、DNA ラダー図を利用して予測して記入してください。
- DNA サンプルとDNA ラダーはゲル上に見えません。ゲル電気泳動が完了したら、どのようにして DNA を可視化できますか？



第5章

組換えプラスミドを得る(形質転換と培養)



はじめに

プラスミドベクターへの遺伝子の挿入は、遺伝子クローニングプロセスの重要な最初のステップです。最終的な目標が特定のタンパク質を大量に生産することである場合、プラスミドを複製し、遺伝子のコピーが多く存在することを確認し、遺伝子を発現させる必要があります。これらはいずれも細胞内で起こる反応です。したがって、遺伝子クローニングプロセスの次のステップは、組換えプラスミドを「形質転換」と呼ばれるプロセスを介して大腸菌に導入することになります。この章では、*rfp* 遺伝子を含む組換えプラスミドを用いて大腸菌の形質転換を行います。ヒト治療用タンパク質を作成する場合、形質転換する細菌にはヒト遺伝子が含まれており、目的のヒト治療用タンパク質を生産することができます。

プラスミドは、ある生物から別の生物に DNA 配列を運ぶための理想的なベクターです。プラスミドには、(1) 遺伝子転写を可能にするプロモーター、(2) DNA 複製の開始のための配列、および(3) 抗生物質耐性遺伝子が装備されています。プラスミドは細菌に取り込まれ、そこで複製され、細菌の細胞機構を使用してその遺伝子を発現します。目的の遺伝子がベクターに挿入されている場合、細菌はその遺伝子によってコードされた生成物、この場合は RFP タンパク質を生成します。

プラスミドの取り込み効率を高めるために、細菌を2つの方法で処理して、「コンピテントセル」にします。まず、正のカルシウムイオンに暴露し、細胞の外膜の負の電荷を中和して、DNA 分子が細胞膜を通過して細胞に入れるようにします。次に、「熱ショック」と呼ばれる急激な温度上昇により、圧力差を生じさせ、プラスミド DNA が外部から細菌細胞に侵入できるようにします。この処理により、約 10,000 個の細菌細胞の1個だけが環境内のプラスミドを取り込みます。組換えプラスミドに抗生物質耐性の遺伝子を含めることにより、抗生物質の存在下で増殖させることができ、形質転換細胞(細菌)を選択できます。

第5章の目標

- 遺伝子クローニングプロセスにおける形質転換の役割を理解する
- 形質転換実験の各対照実験の目的を理解する
- 遺伝子にエンコードされた情報が特性としてどのように表現されるかを理解する

事前の確認

1. 環境からの細菌によるプラスミド取り込みはよくあることだと思いますか？なぜですか？
2. 遺伝子の転写と翻訳に関与するステップには何がありますか？
3. 遺伝子、タンパク質、形質(または観察可能な特性)の関係は何ですか？
4. ヒトの遺伝子を細菌で発現させることを可能にする細菌とヒトとの共通点は何ですか？

演習 5 : ライゲーション産物で細菌を形質転換する

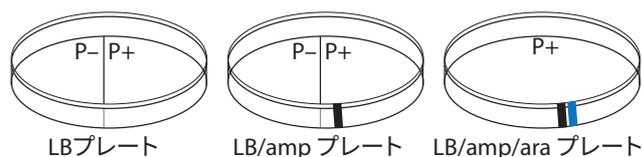
目的の遺伝子を含む組換えプラスミドを作成したら、次のステップではプラスミドを複製し、細菌がタンパク質を生産できるようにします。複製とタンパク質発現(タンパク質が生体内で合成、修飾、および制御される方法)は、細胞内でのみ可能です。したがって、遺伝子クローニングプロセスの次のステップは、組換えプラスミドを「形質転換」と呼ばれるプロセスを介して大腸菌に導入することになります。形質転換では、細菌の DNA の内容が変化します。この章では、*rfp* 遺伝子を含む組換えプラスミドを用いて大腸菌の形質転換を行います。ヒト治療用タンパク質を作成する場合、形質転換する細菌にはヒト遺伝子が含まれており、目的のヒト治療用タンパク質を生産することができます。

演習 3 のベクターには抗生物質抵抗性遺伝子が含まれているため、抗生物質を含んだ培地で培養することで、細菌の増殖を調べ、形質転換の有無を確認できます。また、演習 3 の pARA-R プラスミドを取り込んだ細菌は、赤色蛍光タンパク質を生産しているため、赤色に光ります。

実験の前に

グループで以下の項目について話し合い、クラスと共有する準備をします。

1. アンピシリンは、細胞壁の形成を破壊することにより細菌細胞を殺す抗生物質です。しかし、pARA-R プラスミドにはアンピシリン耐性遺伝子が含まれます。アンピシリン耐性遺伝子はアンピシリンを分解するタンパク質を生成する遺伝子です。アンピシリンの存在下で形質転換された細菌を増殖させる目的は何ですか？
2. pARA-R プラスミドを含む細菌細胞にアラビノースが与えられないとどうなりますか？
3. 演習では、対照群 P- および処理群 P+ のサンプルを、LB、アンピシリン、および糖アラビノースのさまざまな組み合わせを含むシャーレに添加します。シャーレは下の図のように配置されます。



4. 次の**方法**の箇所をすべて読み、用語を使って、フローチャートを作成し、手順を簡単に確認してください。





方法

安全性: 大腸菌の取り扱いには注意が必要です。講師の指示に従って無菌操作を行ってください。無菌技術は、ラボワーカーの安全を確保し、細菌培養物が望ましくない微生物で汚染されないことを保証する一連の手順です。どちらも実験を成功させるために必要です。

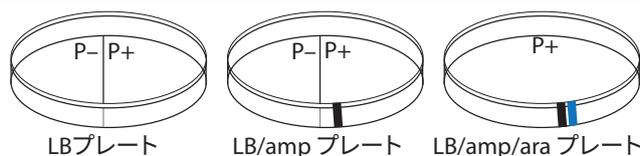
1. 演習3の LIG チューブにグループ ID が書かれていることを確認します。
2. コンピテントセル (CC) のチューブを入手し、上部リムを持ち、すぐに氷の上に置いて保冷します。CC チューブにグループ ID のラベルを付けます。
3. 2 本の微量遠心チューブに「P-」および「P+」とグループ ID のラベルを付けます。
4. CC チューブとともに、P- および P+ チューブを氷上に置きます。
5. P-200 マイクロピペットを入手します。このマイクロピペットは、以下に示すように、CC チューブから P- および P+ チューブにコンピテントセルを添加するために使用されます。
 - a. P-200 マイクロピペットを 50 μ L に設定します。
 - b. 溶液を 2 回静かにピペッティングして、CC チューブ内の細菌細胞を慎重に再懸濁します。次に進む前に、すべての細胞をチューブに戻します。
 - c. 冷やした P- チューブに 50 μ L の CC を加えます。新しいマイクロピペットチップを使用して、P+ チューブに同じ手順を繰り返します。各チューブは保冷のため必ずリムを持ち、すばやく氷上に戻します。
6. P-20 マイクロピペットを用意し、以下の指示に従って「P+」とラベルされたチューブに LIG を添加します。
 - a. P-20 マイクロピペットを 5 μ L に設定します。
 - b. 冷却した P+ チューブの上部リムを持ち、5 μ L の LIG を添加します。液体を 2 回ピペッティングして溶液を混和し、P+ チューブを氷上に戻します。
7. P- および P+ チューブを氷上に 10 分間置きます。

注意: 10 分の間に、「実験の前に」で示された項目 3 への回答を共有して話し合い、ステップ 8 を完了します。

8. 細胞が氷上にある間に、LB、LB / amp (黒線)、および LB / amp / ara (黒線と青線) を 1 枚ずつ、計 3 枚の寒天シャーレを準備します。
 - a. 各シャーレの底部 (寒天を含む部分) にグループ ID を書きます。

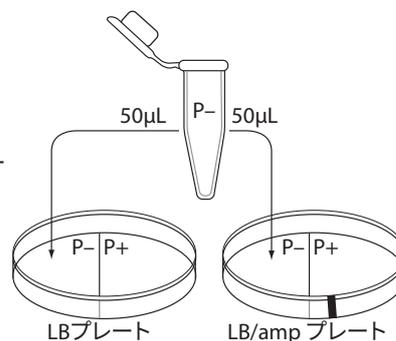
注意: シャーレの端に小さく書いてください。
 - b. シャーレを閉じた状態で、LB シャーレと LB / amp シャーレの底に、シャーレを中央で分割するように線を引きます。各シャーレの半分に「P-」、もう半分に「P+」と書きます。LB / amp / ara シャーレには「P+」というラベルを付けます。シャーレは右ページの上図のように配置されます。





9. 氷上で 10 分間インキュベートした後、氷上の P- および P+ チューブを 42 °C のヒートブロックに**正確に 1 分間だけ**入れておきます。
10. 1 分間の熱ショックの後、**すぐに**チューブを氷上に戻し、少なくとも 1 分間そのままにしておきます。
11. P-200 マイクロピペットを用意し、次の手順に従って P- および P+ チューブに LB を添加します。
 - a. P-200 マイクロピペットを 150 μL に設定します。
 - b. 150 μL の LB を P- チューブに加え、2~3 回ゆっくりとピペッティングして混和します。チューブにキャップをします。
 - c. 新しいマイクロピペットチップを使用して、150 μL の LB を P+ チューブに添加し、2~3 回ゆっくりとピペッティングして混和します。チューブにキャップをします。
12. 時間が許せば、P- および P+ チューブ内の細胞を室温で 15 分間培養します。

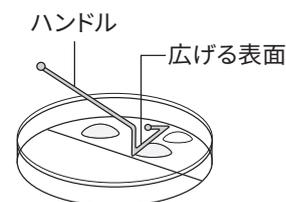
13. 以下の指示に従って、P- チューブから LB および LB / amp シャーレに細胞を添加します。
 - a. P-200 マイクロピペットを 50 μL に設定します。
 - b. P- チューブの細胞を静かに再懸濁し、50 μL の P- 細胞を取り込みます。
 - c. 二枚貝のように半分だけ LB シャーレの蓋を開き、P- チューブから「P-」と書かれたセクションに 50 μL の細胞を加えます。ふたを閉じます。



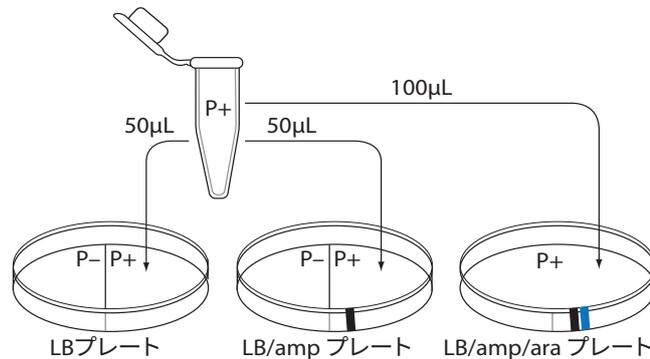
14. 新しいマイクロピペットチップを使用して、ステップ 13b および 13c を繰り返し、P- チューブから LB / amp シャーレに 50 μL の細胞を加えます。
15. LB および LB / amp シャーレ上に P- チューブから細胞を広げます。

ラボ技術: スプレッダーはハンドル部分を持ち、汚染防止のため、曲がった端がどこにも触れないようにします。使用済みのスプレッダーはバイオハザードバッグに入れます。

- a. スプレッダーはハンドルだけを持って、他の部分に触れないでください。
- b. ハマグリノの殻のように LB シャーレの蓋を開け、細胞を P- 側のみに優しく広がります。
- c. 同じスプレッダーを使用して、LB / amp シャーレで手順を繰り返します。



16. シャーレごとに新しいマイクロピペットチップを使用して、50 μ Lの細胞を P+ チューブから LB および LB / amp シャーレに添加します。その際、各シャーレの P+ 側にのみ細胞を添加します。シャーレに添加する前に、静かにピペティングして細胞を混和してください。



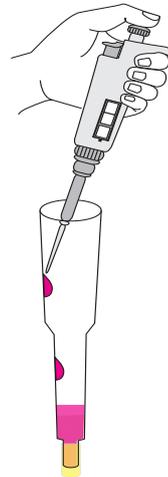
17. 同じ手法を使用して、P+ チューブから 100 μ Lの細胞を LB / amp / ara シャーレに添加します。細胞はシャーレに添加する前にピペティングで上下にゆっくりと混和し、シャーレに添加して下さい。
18. LB、LB / amp、および LB / amp / ara シャーレの P+ チューブから細胞を広げます。その際、LB および LB / amp シャーレは P+ 側のみに細胞を広げてください。
- スプレッダーは都度替えてください。
 - LB / amp / ara シャーレの場合、P+ スプレッダーの下でシャーレを静かに回転させて、細胞がシャーレの表面全体に均等に広がるようにします。寒天をこすらないでください。
19. すべての微量遠心チューブ、マイクロピペットチップ、およびセルスプレッダーをバイオハザード容器に入れます。
20. 3枚すべてのシャーレを積み重ねてからラップで包みます。
21. フタの結露が寒天に落ちるのを防ぐために、重ねたシャーレを逆さまにして 37 $^{\circ}$ Cインキュベーターに入れます。講師の指示に従って実験台の表面を拭いてから、手を洗います。
22. 37 $^{\circ}$ Cで 16~24 時間、シャーレを培養します (24 時間を超える場合は冷蔵庫で保管します)。
23. 16~24 時間後、シャーレを観察してノートにコロニー数を記録します。
24. 指示された場合、シャーレはバイオハザード容器に廃棄します。



考えましょう。

- P+ 細菌培養物は P- 細菌培養物の処理とどのように違いますか？ (培養物は孤立した細胞集団です)
- P- 細胞培養の目的は何ですか？
- なぜ細胞には熱ショック後に回復する時間が必要なのですか？
- なぜ細胞は 37 $^{\circ}$ Cで培養されるのですか？
- この演習では無菌技術を使用しました。なぜ無菌技術を使うことが重要なのですか？
- 3枚のプレートで、どのようにコロニーができるか予想してみましょう。

タンパク質の精製(カラム)



はじめに

遺伝子工学は医療に用いるタンパク質の生産に利用されます。例えば、糖尿病を治療するためには、まずヒトインスリン遺伝子を組み込んだプラスミドを作製します。そして、細菌に組換えプラスミドを導入して遺伝子を発現させ、インスリンを産生します。これまでの実習では、ヒト遺伝子の代わりに *rfp* 遺伝子を用いて、これらのプロセスについて学んできました。

プロセスの最終ステップは、目的のタンパク質を得ることです。そのために、細菌を溶解する(細胞壁を破壊する)試薬で細菌を処理し、カラムクロマトグラフィーと呼ばれる方法で細胞抽出液から目的のタンパク質を分離します。(クロマトグラフィーは、物質の性質の違いを利用して目的の物質を分離する方法です。カラムクロマトグラフィーでは、物質の分離に利用できるビーズを充填したカラムを使用します。)

この章では、この最終ステップを実施します。第5章で形質転換した細菌を溶解した後、電荷に基づいてタンパク質を分離するカラムを用いて、クローニングした *rfp* 遺伝子によってつくられた赤色蛍光タンパク質(RFP)を精製します。医薬品用にタンパク質を単離する場合もこれと同じプロセスです。

第6章の目標

- 細菌の増殖に有利な条件を理解する
- タンパク質の立体構造(三次元形状)がその機能とどのように関連しているかを理解する
- タンパク質の折り畳み(タンパク質に特徴的で、その機能に不可欠な三次元構造に至る物理的プロセス)がどのように起こるかを理解する
- カラムクロマトグラフィーによるタンパク質の分離方法を理解する

事前の確認

1. 細菌はどのように増殖しますか？
2. タンパク質は、なぜ重要な分子といわれるのでしょうか？
3. タンパク質の立体構造（形状または折り畳み）は、その機能にとってどのように重要なのでしょうか？ タンパク質機能（酵素としての機能（反応速度の高速化）、分子の運搬、シグナル伝達、構造の形成）のうち1つに焦点を当てましょう。

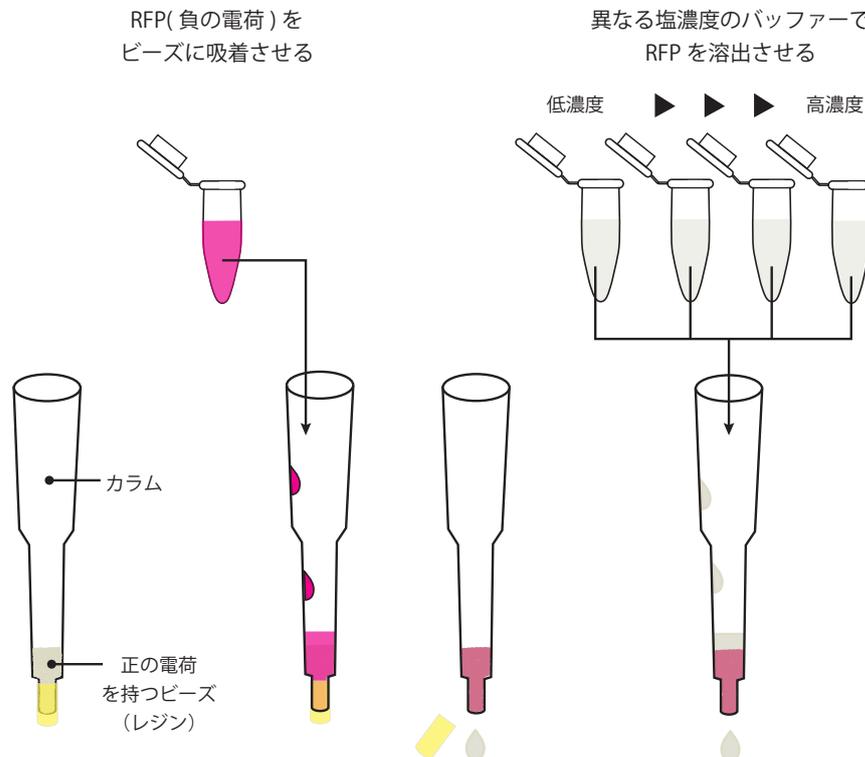
演習 6: 蛍光タンパク質を精製する



前の演習では、細菌を形質転換し、LB、アンピシリン、アラビノースを含むシャーレにて目的のプラスミドを持つ細菌を選別しました。次に、1つのコロニーを選択し、フラスコで増殖させて、すべての細胞が1コピー以上の組換えプラスミドを含む大きな同一細胞集団にしました。また、培地にアラビノースを加え、細菌によるRFPの産生を促しました。

この演習の前半では、「溶解バッファー」という試薬を使用して、細胞を溶解（破壊）します。

演習の後半では、カラムクロマトグラフィーを使用して、試料からRFPを分離します。アミノ酸の特性により、カラムクロマトグラフィーを使用して、RFPを他のタンパク質から分離することができます。RFPは、中性の溶液中では負の電荷を有しています。この実験では、負の電荷をもつ物質を引き付け、正の電荷をもつ物質（小さな樹脂ビーズ）が詰められたカラムを使用します。試料をカラムに通すと、負の電荷をもつRFPがビーズにくっつき、正の電荷をもつタンパク質が通過します。次に、低濃度の塩溶液を使用して、ビーズに弱く結合しているタンパク質を洗い流します。最後に、より高濃度の塩溶液を使用して、結合したRFPをカラムから溶出させます。



実験の前に

グループで以下の項目について話し合い、クラスと共有する準備をします。

1. 陰イオン交換クロマトグラフィーに、さまざまな塩濃度の溶液を流すことで、RFP が分離できるのはなぜでしょうか。原理を考えましょう。
2. パート A と B の **方法** をすべて読み、用語を使ってフローチャートを描き出し、手順を確認します。

安全性: 大腸菌の取り扱いには注意が必要です。講師の指示に従って無菌操作を行ってください。無菌技術は、実験者の安全を確保しつつ、細菌培養物が望ましくない微生物で汚染されること(コンタミ)を防止する手順です。また、本演習で取り扱うのは遺伝子組換え生物です。取扱いには法律による規制があり、適切な滅菌作業無しに廃棄することは法令違反になります。



パートA: 培養した細菌の溶解 方法

1. 大腸菌チューブを観察し、ノートにその色を記録します。
2. 大腸菌に溶解バッファー (LyB) を 300 μ L 加えて、ピペッティングにより十分に懸濁します。
3. 室温で 15 分間静置します。
4. 微量遠心分離機でチューブを 3 分間回転させて、細胞と上清を分離します。
5. P-200 マイクロピペットを使用して、ペレットを乱すことなく上清を慎重に回収して、新しいチューブに移します。

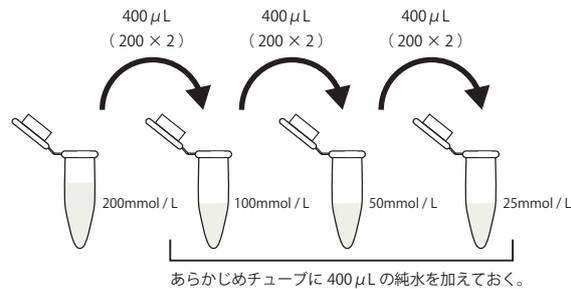
考えましょう。

上清は何色ですか？ ペレットは？ それぞれの内容物は何ですか？



パートB: カラムクロマトグラフィーによる 赤色蛍光タンパク質の分離 方法

1. 講師の指示に従って、異なる濃度の NaCl 溶液を400 μ L ずつ作製します (25, 50, 100, 200 mmol / L)。



2. 講師の指示に従って、クロマトグラフィーカラムをセットします。
 - a. カラムの下に廃液容器をセットします。
 - b. カラムの下部にある栓を外して、液体を廃液容器に排出します。
3. P-200 マイクロピペットを使用して、パート A の上清をカラムの側面にゆっくりと加えます。カラム内の溶液を廃液容器に排出します。
4. カラムを調べて、RFP を確認します。それは樹脂ビーズ全体に広がっていますか、それとも単一の領域に限定しているように見えますか？ 観察したことを記録してください。
5. カラムの下に溶液回収用チューブをセットします。
6. 最も濃度が低い NaCl 溶液をカラムに400 μ L 加えます。カラム内の溶液はチューブに回収します。
7. 新しいチューブをセットして、次の濃度の NaCl 溶液を用いて作業を繰り返します。
8. どのNaCl濃度の時に RFP が溶出されたか、周りのグループと比較しましょう。また、色の強度に違いはありますか？ 観察結果をノートに記録します。
9. 廃液容器の内容物、チューブ内の溶液、チューブ等は、適切に滅菌して廃棄する必要がありますので、指示に従って廃棄します。